กัญญา กอแก้ว 2554: การโคลนและการศึกษาลักษณะของยีนไซโลสรีดักเทสจากเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนร้อน *Ogataea siamensis* N22 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. 121 หน้า

โคลนยีนไซโลสรีดักเทส (*XYL1*) ของเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนร้อน *Ogataea siamensis* N22 จากยีโนมิกดีเอ็นเอและคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้โคลนรหัส pOSXR2-88 ที่มียีนไซโลสรีดักเทสความยาว 835 นิวคลีโอไทด์แทรกอยู่ในพลาสมิดแต่ยังขาดส่วนของยีนด้าน 3' จึงตามหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีนด้วยวิธี 3' RACE เมื่อรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากทั้งสองวิธีเข้าด้วยกัน ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนไซโลสรีดักเทสความยาว 960 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบตำแหน่ง TATA box-like คือ $^{-112}$TATAA^{-108} ห่างจาก start codon ขึ้นไปทางปลาย 5' และพบตำแหน่ง polyadenylation signal คือ ^{974}AATAAA^{979} อยู่ห่างจาก stop codon ไปทางด้าน 3' ได้ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. FJ763639) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 คล้ายคลึงกับอัลโดสรีดักเทสของยีสต์ *Candida boidinii* มากที่สุด เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสของ *O. siamensis* N22 พบว่ามีความแตกต่างจากไซโลสรีดักเทสของยีสต์อื่นอยู่ 3 ตำแหน่ง แต่ไม่ใช่บริเวณ active site และพบว่ามีลำดับกรดอะมิโน IPKS ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของบริเวณ active site เช่นเดียวกับไซโลสรีดักเทสของยีสต์อื่น

เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนไซโลสรีดักเทสในยีสต์ *O. siamensis* N22 ด้วยการสร้างพลาสมิดลูกผสม pPICOSXR และ pGAPOSXR ภายใต้โปรโมเตอร์ของยีน alcohol oxidase (*AOX*) และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAP*) ตามลำดับ พลาสมิดลูกผสมจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์เจ้าบ้าน การศึกษาการแสดงออกของยีนจากกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิด pPICOSXR มีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ระหว่าง 0.044 ถึง 0.098 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลง N22-pPICOSXR30 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 0.098 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 2.2 เท่า ของค่าที่ตรวจพบจากยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น ส่วนยีสต์สายพันธุ์ดัดแปลงที่ได้รับพลาสมิด pGAPOSXR พบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.062 ถึง 0.093 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยยีสต์สายพันธุ์ N22-pGAPOSXR3 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.093 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 1.5 เท่าของยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสจาก *O. siamensis* N22 และสายพันธุ์ดัดแปลงใช้ NADPH เป็นโคเอนไซม์เท่านั้น

/ /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์